

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL
Grado en biotecnología



Caracterización de la interacción entre STBD1 y Laforina. Determinación de su posible papel para el desarrollo de la enfermedad de Lafora

Trabajo fin de grado, curso 2014/2015

Autora: M^a Victoria García Castiglioni

Tutor académico: Dra. M^a Adelaida García Gimeno
Tutor externo: Dr. Pascual Sanz Bigorra
Cotutor externo: Carla Rubio Villena

Valencia, Julio de 2015

Caracterización de la interacción entre Stbd1 y Laforina. Determinación de su posible papel para el desarrollo de la enfermedad de Lafora

Resumen:

La enfermedad de Lafora (LD, OMIM: 254780) es una epilepsia mioclónica progresiva, caracterizada por una degeneración neuronal, acumulación de cuerpos de inclusión de glucógeno insoluble poco ramificados (llamados cuerpos de Lafora) y una desregulación de la homeostasis de proteínas (proteostasis). STBD1 (Starch binding domain-containing protein 1) está implicada en el metabolismo de glucógeno, posiblemente en su degradación. Esta proteína posee un dominio de unión a carbohidratos que se cree podría intervenir en el anclaje de glucógeno a las membranas. En respuesta a condiciones de estrés, tal como la carencia de glucosa, STBD1 es capaz de interaccionar con laforina, una de las proteínas cuya mutación causa la enfermedad de Lafora. En dichas situaciones, también se ha visto que cambia la localización celular de laforina del citoplasma al núcleo, por lo que cabría la posibilidad de que STBD1 anclara a laforina en el citoplasma en ausencia de estrés. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que laforina migra al núcleo en situaciones de estrés independientemente de la sobreexpresión de STBD1. Por otra parte, laforina forma un complejo funcional con una E3 ubiquitin ligasa, malina, la otra proteína cuya mutación causa la enfermedad de Lafora. Dicho complejo promueve la ubiquitinación, entre otras, de proteínas involucradas en el metabolismo del glucógeno, destinándolas mayoritariamente a la vía de degradación mediada por autofagia. STBD1 podría ser un sustrato de ubiquitinación del complejo malina-laforina. En este trabajo se demostró que STBD1 es un sustrato de ubiquitinación de este complejo, y que la topología de la poliubiquitinación tiene lugar a través de los residuos de lisina 63 de la ubiquitina, por lo que STBD1 se degradaría mediante autofagia, mediada, al menos en parte, por el complejo laforina-malina.

Abstract:

The Lafora disease (LD, OMIM: 254780) is a progressive myoclonic epilepsy, which is characterized by a neuronal degeneration, accumulation of insoluble and poorly branched glycogen inclusion bodies (named Lafora bodies) and an imbalance in the protein homeostasis (proteostasis). STBD1 (Starch binding domain-containing protein 1) is involved in glycogen metabolism, probably in its degradation. This protein contains a carbohydrate binding domain which might have a function anchoring glycogen to membranes. Under stress conditions, such as glucose deprivation, STBD1 interacts with laforin, one of the proteins whose mutation causes the Lafora disease. In these conditions, it has also been shown that the cellular localisation of laforin changes from the cytoplasm to the nucleus, in that regard it could be possible that STBD1 might act as an anchor for laforin in the cytoplasm when the stress is absent.

It is also known that laforin and an E3 ubiquitin ligase, malin, the other protein whose mutation causes Lafora disease, form a functional complex. The complex promotes the ubiquitination of, amongst others, proteins involved in the glycogen metabolism, which undergo autophagy-mediated degradation.

STBD1 could be a substrate of ubiquitination of the malin-laforin complex. In our work, we have demonstrated that STBD1 is a substrate of ubiquitination of this complex, and the topology of polyubiquitination is formed through lysine-63 residues of the ubiquitin molecules, which indicates that STBD1 would be degraded by autophagy modulated at least in part by the malin-laforin complex.

Palabras clave: laforina, malina, STBD1, ubicuitinación, glucógeno.

Key words: laforin, malin, STBD1, ubiquitination, glycogen.

Autora: María Victoria García Castiglioni

Tutor académico: Dra. M^a Adelaida García Gimeno

Tutor externo: Dr. Pascual Sanz Bigorra

Cotutor externo: Carla Rubio Villena

Valencia, Julio de 2015

Agradecimientos:

Quiero agradecer aquí, en el único lugar donde puedo ponerlo por escrito, a mis padres, por los inmensos sacrificios que han hecho por mí a lo largo de toda mi vida. Gracias por permitirme tener todas estas oportunidades y por todo el amor que me habéis dado.

He de agradecer también al laboratorio de Pascual, que me ha acogido con muchísimo cariño. Gracias por tener paciencia conmigo, sobre todo los primeros días, por ir dejándome sola poco a poco a pesar de que me entrara el pánico, por ayudarme en todo lo que me ha hecho falta. He tenido muchísima suerte con todos vosotros. Quiero agradecer más aún a Carla y a Pablo, por dedicar tantas horas de vuestro tiempo y por vuestra motivación al enseñarme desinteresadamente.

Índice

Introducción	VI
Malina	VII
Laforina	VIII
STBD1	IX
Objetivos	X
Materiales y métodos	XI
Cepas bacterianas	XI
Líneas celulares	XI
Plásmidos	XI
Transfección de células de mamífero	XII
Fraccionamiento núcleo-citoplasma	XII
Bradford	XIII
Western Blot	XIII
Microscopía	XVI
Ensayo de ubicuitinación	XVI
Resultados	XIX
1. Localización celular de STBD1	XIX
2. Localización celular de laforina dependiente de ayuno	XXI
3. Localización celular de laforina en presencia de STBD1	XXIII
Discusión	XXX
Bibliografía	XXXII

Introducción

La epilepsia mioclónica progresiva de tipo Lafora (LD, OMIM: 254780) es una grave enfermedad neurodegenerativa de herencia autosómica recesiva que aparece durante la adolescencia. Fue descrita por primera vez por el neurólogo español Gonzalo Rodríguez Lafora en 1911 (Lafora 1911) y está considerada una enfermedad rara pues tiene una prevalencia $<1/1.000.000$ habitantes. Las primeras manifestaciones de la enfermedad aparecen durante la adolescencia con dolores de cabeza, mioclonías (sacudidas repentinas e involuntarias de los músculos) y alucinaciones. Rápidamente la enfermedad progresa a demencia, apraxia (incapacidad de ejecutar movimientos coordinados), afasia (incapacidad de comunicarse mediante el habla, escritura o mímica) y pérdida visual, llevando a un estado vegetativo y finalmente a la muerte (Revisión por Ramachandran, Girard et al. 2009).

Estudios histológicos de los pacientes muestran la presencia de poliglucosanos intracelulares (acumulaciones densas y malformadas de glucógeno insoluble, apodadas cuerpos de Lafora), en cerebro, músculo, hígado y corazón. Se encuentran en todas las áreas del cerebro y en la mayoría de neuronas, específicamente en los cuerpos celulares y las dendritas. Los pacientes sufren muerte neuronal y acumulan cuerpos de Lafora a medida que envejecen (Yokoi, Austin et al. 1968). Los cuerpos de Lafora, al estar formados por un tipo de polisacárido poco ramificado, son insolubles. Podrían originarse por un desequilibrio en la actuación de la glucógeno sintetasa y la enzima ramificante (encargada de producir ramificaciones en la estructura del polisacárido), o bien por la presencia de grupos fosfato en el polisacárido que impediría la acción de la enzima ramificante (Revisión por Ramachandran, Girard et al. 2009). Además, defectos en los dos mayores sistemas de degradación de proteínas, el sistema ubiquitina-proteasoma y la autofagia, han sido descritos en pacientes con la enfermedad (Vernia, Rubio et al. 2009, Aguado et al. 2010, Criado et al. 2012).

Se han encontrado dos genes implicados en la patología, EPM2A (Epilepsy of Progressive Myoclonus type 2 gene A), que codifica la proteína laforina (Minassian, Lee et al. 1998, Serratosa, Gómez-Garre et al. 1999), y EPM2B, que codifica la proteína malina (Chan, Bulman et al. 2003). Los pacientes con mutaciones en uno de los dos genes implicados son clínicamente indistinguibles, sugiriendo que ambas proteínas funcionan en una ruta fisiológica común. De hecho, se ha demostrado que las dos proteínas forman un complejo funcional (Vilchez, Ros et al. 2007, Solaz-Fuster, Gimeno-Alcaniz et al. 2008, Worby, Gentry et al. 2008).

Malina

El gen EPM2B, cuyo producto es la proteína malina, está localizado en el cromosoma 6q22.3 y consta de un único exón. Es una proteína de 395 amino ácidos que contiene un dominio de tipo RING en su región N-terminal y seis repeticiones de un motivo NHL de interacción proteína-proteína en el extremo C-terminal, y funciona como una E3 ubiquitina ligasa.

La ubiquitinación es un tipo de modificación post-traducciona que consiste en la unión de una o varias moléculas de ubiquitina a una proteína mediante un enlace covalente. La función de la ubiquitinación generalmente es dirigir a las proteínas ubiquitinadas a la degradación proteasomal, pero también hay funciones no degradativas, como el tráfico de proteínas, la reparación de DNA y la autofagia.

El proceso de ubiquitinación es llevado a cabo por un complejo enzimático en el que intervienen tres enzimas. La enzima activadora (E1) activa una molécula de ubiquitina, que transfiere a una enzima conjugasa (E2) y finalmente al sustrato a través de una ubiquitina ligasa (E3). La molécula de ubiquitina presenta siete residuos de lisina clave (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63), a través de los cuales es posible formar cadenas de poliubiquitinación (Pickart and Fushman 2004).

El tipo de cadena de ubiquitina formada dependerá del residuo de lisina al que se une la glicina de la siguiente molécula de ubiquitina, y determinará la función de la ubiquitinación y el destino de la proteína ubiquitinada. La poliubiquitinación a través de K63, que dirige al sustrato hacia vías no proteolíticas, es la poliubiquitinación que se encuentra en la mayoría de los sustratos de malina. Los sustratos de malina generalmente están encaminados hacia la vía de la autofagia (Moreno, Towler et al. 2010, Rubio-Villena, Garcia-Gimeno et al. 2013).

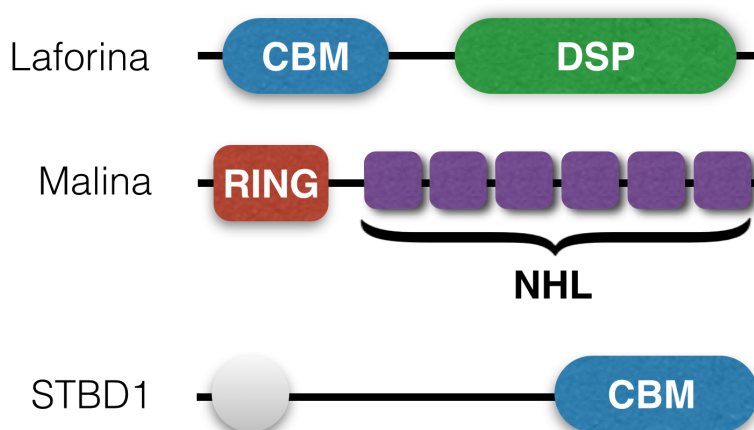


Figura 1. Dibujo esquemático de los principales dominios de laforina, malina y STBD1. La laforina presenta un dominio CBM (Carbohydrate Binding Module) en el extremo N terminal y un dominio DSP (Dual Specificity Phosphatase) en el extremo C terminal. El dominio RING de la malina en su extremo N terminal es un dominio de tipo dedos de zinc común a las E3 ubiquitina ligasas, y los seis dominios NHL están involucrados en interacciones proteína-proteína. STBD1 presenta una región hidrofóbica en el extremo N terminal y un dominio CBM en el extremo C terminal.

Laforina

El gen EPM2A, cuyo producto es la proteína laforina, está localizado en el cromosoma 6q24 del genoma humano, tiene 130 kb y cuatro exones. Se expresa en todos los tejidos, pero los mayores niveles de expresión tienen lugar en el cerebro, músculo esquelético, corazón e hígado. La expresión de laforina aumenta después del nacimiento y llega a su máximo en la etapa adulta. Laforina es una fosfatasa de tipo dual de 331 amino ácidos que presenta un dominio de unión a carbohidratos (CBM) en su extremo N-terminal y un dominio fosfatasa de especificidad dual (DSP) en su extremo C-terminal. La pérdida de función en alguno de estos dominios conduce al desarrollo de la enfermedad (Revisión por Singh and Ganesh 2009).

Laforina puede prevenir la LD por dos mecanismos: (a) evitando la hiperfosforilación de glucógeno mediante su desfosforilación, permitiendo así que se ramifique correctamente; y (b) funcionando como una proteína adaptadora, que reconoce sustratos específicos y los presenta a malina para su ubiquitinación (Gentry, Romá-Mateo et al. 2013). Estas dos funciones son independientes, ya que un mutante sin actividad fosfatasa sigue funcionando reclutando malina y dirigiéndola hacia sus sustratos (Worby, Gentry et al. 2008).

El glucógeno es un polisacárido fosforila ya que la enzima glucógeno sintetasa incorpora erróneamente B-fosfatos de UDP-glucosa al ritmo de 1 fosfato por 10.000 glucosas (Tagliabracci, Heiss et al. 2011). La función de la desfosforilación de laforina tiene como objetivo prevenir este error enzimático mediante la eliminación de los fosfatos del glucógeno, permitiendo así que el metabolismo de este polisacárido funcione correctamente. Cuando esta actividad se pierde, el glucógeno acumula residuos de fosfato en sus cadenas, se impide que se ramifique, y se forma un complejo insoluble (Tagliabracci, Turnbull et al. 2007, Tagliabracci, Girard et al. 2008).

La laforina, además de su actividad independiente como fosfatasa de glucógeno funciona como una proteína adaptadora en el complejo que forma con malina, reclutando a los sustratos que malina ubiquitina. Muchos de estos sustratos están involucrados en la síntesis de glucógeno, como la glucógeno sintetasa (Vilchez, Ros et al. 2007), R5 (PTG), subunidad reguladora de la proteína fosfatasa tipo 1 (Worby, Gentry et al. 2008), GDE, enzima desramificante de glucógeno (Cheng, Zhang et al. 2007), neuronatina (Sharma, Rao et al. 2011), AMPK (Moreno, Towler et al. 2010) y R6 (Rubio-Villena, Garcia-Gimeno et al. 2013). La mayoría de las cadenas de poliubiquitinas producidas están formadas por ubiquitinas enlazadas a través de residuos Lys63 (Moreno, Towler et al. 2010), lo que significa que la mayoría de las proteínas ubiquitinadas por malina no van a ser degradadas mediante el proteasoma, si no que serán dirigidas hacia la vía de la autofagia (Ikeda and Dikic 2008, Rubio-Villena, Garcia-Gimeno et al. 2013). Por tanto, es posible concluir que la presencia de malina y laforina previene la síntesis de glucógeno insoluble y la formación de cuerpos de Lafora en neuronas (Vilchez, Ros et al. 2007).

El complejo malina-laforina también parece estar involucrado en la protección de las células frente al estrés de retículo endoplásmico (ER) (Vernia, Rubio et al. 2009) y el choque térmico (Sengupta, Badhwar et al. 2011). Estudios realizados con cultivos celulares parecen indicar que en ausencia de laforina hay una mayor sensibilidad a condiciones que causan estrés de retículo endoplásmico, así como una menor actividad en el proteasoma y una mayor apoptosis, lo que podría ser importante en el desarrollo de la enfermedad de Lafora (Vernia, Rubio et al. 2009). El choque térmico puede ser inducido por una variedad de agentes estresantes. Como respuesta a estos agentes se induce la expresión de proteínas de estrés por choque térmico (HSPs), que estabilizan las proteínas parcialmente plegadas (Morimoto 1998, Morimoto 2008). La presencia de laforina y malina es necesaria para que las HSPs protejan a la célula del estrés inducido por las proteínas mal plegadas, ya que mediante la ubiquitinación dirigen a las proteínas mal plegadas hacia su degradación (Garyali, Siwach et al. 2009).

La localización celular de laforina parece ser dependiente del contenido de glucógeno celular y el contenido de glucosa extracelular, y su estabilidad dependiente de los niveles celulares de ATP. La localización celular de laforina ha sido descrita en retículo endoplásmico por Ganesh *et al*, Minassian *et al* y Dubey y Ganesh. Estudios realizados con cultivos celulares han mostrado que la laforina migra del citoplasma al núcleo cuando las células crecen en medio sin glucosa. El significado de dicha migración no está muy claro (Singh, Singh et al. 2012). Una migración de laforina del citoplasma al núcleo también se ha visto cuando las células se someten a un choque térmico (Sengupta, Badhwar et al. 2011).

STBD1

STBD1 (Starch-Binding Domain-containing protein 1) fue descrita por primera vez por Bouju *et al* y recibió el nombre de GENX-3414. Esta proteína se expresa principalmente en músculo, hígado, corazón y placenta, y está asociada a membranas y retículo endoplásmico en tejido muscular (Bouju, Lignon et al. 1998). Su localización celular parece concentrarse en las regiones perinucleares y en el retículo endoplásmico, y su función parece estar relacionada con el metabolismo del glucógeno (Jiang, Heller et al. 2010).

Igual que laforina, STBD1 contiene un dominio de unión a carbohidratos (CBM20) en su extremo C-terminal (Wang, Stuckey et al. 2002, Christiansen, Abou Hachem et al. 2009), que le capacita para unirse a glucógeno (Jiang, Heller et al. 2010).

La función de STBD1 no ha sido elucidada aún, pero podría estar involucrada en regular la degradación del glucógeno por vía lisosomal. Esta hipótesis está reafirmada por el hecho de que STBD1 puede interactuar con proteínas implicadas en el proceso de autofagia (Jiang, Wells et al. 2011). Cabe destacar que STBD1 se asocia mejor al glucógeno anormal, con menos ramificaciones, que al glucógeno normal

(Jiang, Heller et al. 2010). Esto sugiere que STBD1 podría seleccionar glucógeno anormal para su transporte a lisosomas y posterior reciclaje. Asimismo, cabe destacar que la degradación de glucógeno por autofagia ocurre especialmente cuando hay una situación de estrés, como el ayuno que lleva a bajos niveles de glucógeno (Reichelt, Mellor et al. 2013). En condiciones de privación de glucógeno también se ha descrito que la interacción entre laforina y STBD1 es mayor (Zhu, Zhang et al. 2014). Por tanto, la interacción STBD1-laforina podría funcionar como un sensor que indicara bajos niveles de glucógeno intracelular.

Objetivos

El objetivo fundamental de este proyecto es tratar de caracterizar la interacción que tiene lugar entre STBD1 y laforina, y para ello se han planteado dos hipótesis:

- La primera consiste en estudiar el posible papel de STBD1 en la migración de laforina al núcleo en una situación de estrés celular.
- La segunda hipótesis postula a STBD1 como un posible sustrato del complejo malina-laforina, y que por tanto, podría ser ubiquitinado por el complejo.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas

Se utilizó la cepa DH5α de *Escherichia coli* para la clonación y amplificación de los plásmidos utilizados en este trabajo. Las bacterias se crecieron en medio LB (peptona 1%, extracto de levadura 0,5% y NaCl 1% pH 7,5) suplementado con 100 µg/mL de ampicilina o kanamicina, en agitación a 37°C.

Líneas celulares

Las células humanas SH-SY5Y (Health Protection Agency Culture Collection, Salisbury, UK), una sublínea celular de neuroblastoma obtenida a partir de un tumor metastásico de médula ósea, fueron utilizadas para el estudio de la localización subcelular de STBD1 y Laforina.

Las células humanas Hek293 (Health Protection Agency Culture Collection, Salisbury, UK), provenientes de riñón embrionario, fueron utilizadas para el estudio de la ubicuitinación de STBD1.

Ambos tipos celulares se crecieron en un incubador a 37°C con 5% de CO₂ y condiciones adecuadas de humidificación.

Las células SH-SY5Y se crecieron en medio DMEM-F-12 (GIBCO) (con 10 mM de glucosa), suplementado con 100 u/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mM glutamina, 10 mM HEPES y 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado (FBS, Invitrogen, Madrid, España).

Las células Hek293 se crecieron usando medio DMEM (Lonza, Barcelona, España), suplementado con 100 u/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mM de glutamina y 10% (v/v) de FBS inactivado.

Plásmidos

Para este experimento se utilizaron los plásmidos 6xHisUbiq (Dr. M. Rodriguez, Proteomics Unit, CIC-BioGUNE, Vizcaya, Spain), HA-STBD1 (Dr. A. Cheng, Dep Biochemistry & Molecular Biology, University of Louisville, KY, USA), Myc-Laforina, Flag-Malina y Flag-Laforina (descritos en Solaz-Fuster et al, 2008), pFlag-CMV (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA), pCMV-6xHisUbiq K48R y K63R (Dr. Ch. Blattner, Institute of Toxicology and Genetics, Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Germany), pCMV-HA y pCMV-Myc (Clontech Laboratories, Inc., A Takara Bio Company. Mountain View, CA, USA).

Los plásmidos se purificaron utilizando Plasmid DNA purification (Nucleobond® Xtra Midi, Macherey-Nagel, Düren, Germany).

Transfección de células de mamífero

- Las células SH-SY5Y se transfectaron usando Xfect™ Transfection Reagent (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France). Para cada placa de 60 mm de diámetro a transfectar se preparó un tubo eppendorf con un volumen final de 600 µl, con 1.500 ng de plásmido, 4,5 µL de Xfect Polymer y el volumen restante de Xfect Reaction Buffer. Antes de comenzar el experimento se atemperaron los reactivos de transfección, Xfect Polymer y Xfect Reaction Buffer. Se homogeneizó Xfect Polymer usando el vortex. A cada tubo eppendorf se le añadió el volumen correspondiente de Xfect Polymer y 1500 ng de plásmido, se homogeneizaron las mezclas y se añadieron 4.5 µL de Xfect Polymer. Tras homogeneizar se incubaron los tubos 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente la mezcla de transfección fue depositada homogéneamente sobre las placas. Las placas se incubaron a 37°C toda la noche.
- Las células Hek293 se transfectaron usando X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Para cada placa de 100 mm de diámetro a transfectar se preparó un tubo eppendorf con 3 µg de cada plásmido, 3 µL de X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent por cada µg de plásmido y el volumen de Opti-MEM® Reduced Serum Medium necesario para completar un volumen final de 900 µL. En el caso del plásmido Flag-Malina se usaron 6 µg por transfección. A cada tubo eppendorf se le añadió el volumen de Opti-MEM correspondiente, 3 ó 6 µg de cada plásmido y se homogeneizó con pipeta. Posteriormente se añadió X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent, se homogeneizó y se incubaron los tubos 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de transfección fue depositada homogéneamente sobre las placas y se incubaron éstas a 37°C durante la noche.

Fraccionamiento núcleo-citoplasma

Se prepararon 1 mL de tampón A [HEPES 10 mM, KCl 25 mM, EGTA 0,1 mM, EDTA 0,1 mM, PMSF 0,5 M, DTT 1 mM, NaF 1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, Na₄P₂O₇ 2,5 mM y los inhibidores de proteasas Complete Mini, EDTA-free Protease inhibitor (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)] y 100 µL de tampón B [HEPES 10 mM, NaCl 0,4 mM, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 M, DTT 1 mM, NaF 1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, Na₄P₂O₇ 2,5 mM y los inhibidores de proteasas Complete Mini, EDTA-free Protease inhibitor (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)] por muestra. El PMSF se añadió en el momento de utilizar el tampón debido a su corta vida media en solución acuosa.

En la cabina de cultivos se lavaron con PBS las placas de 60 mm de diámetro que contenían las células, se añadieron 0,3 mL de tripsina a cada placa y se incubaron 3 minutos a 37°C. Posteriormente se le añadieron 9 mL de medio de cultivo para neutralizar la tripsina, se recogieron las células en un corning de 15 mL y se centrifugaron 4 minutos a 1.400 r.p.m. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 400 µL de tampón A frío antes de incubar 15 minutos en hielo.

Se pasó el contenido a un tubo eppendorf de 1,5 mL al cuál se le añadió 25 µL de la solución Nonidet-P40 10%. Se homogeneizó el contenido utilizando un vortex durante 10 segundos y posteriormente se centrifugaron los tubos durante 30 segundos a máxima velocidad a 4° C.

El sobrenadante, la fracción citoplasmática soluble, se recogió en un tubo eppendorf, al cual se le añadió tampón de carga 2x (Tris·HCl 125 mM pH 6,8, glicerol 20% (v/v), SDS 4% (v/v), azul de bromofenol 0,04 mg/mL, ditioneitol (DTT) 31 mg/mL) en relación 1:1. Las proteínas se desnaturalizaron durante 3 minutos a 100°C y después se congelaron hasta su uso. Se reservaron 2 µL de fracción citoplasmática soluble antes de añadir el tampón de carga 2x para medir la concentración de proteínas mediante el reactivo de Bradford.

El pellet se lavó con 600 µL de tampón A. Se centrifugó 30 segundos a máxima velocidad a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet nuclear se resuspendió en 70 µL de tampón B frío y se agitó 1 hora en un agitador localizado en una cámara a 4 °C.

Tras el período de agitación se añadieron 70 µL de tampón de carga 2x y se desnaturalizaron las proteínas mediante ebullición durante 3 minutos 100° C. Las muestras se congelaron hasta su uso.

Bradford

En cubeta de espectrofotómetro desechable se añadieron 1 mL de Bio-Rad Bradford Protein Assay Reagent (Bio-Rad, Murcia, España) y 1 µL de muestra a analizar. Se taparon las cubetas con parafilm y se agitaron bien, previa incubación durante 5 min a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 595 nm. La concentración de proteínas se calculó de acuerdo a una recta patrón elaborada con cantidades conocidas de BSA.

Western Blot

Puesto que las proteínas a analizar tenían un tamaño comprendido entre 15 y 100 kDa, en todos los experimentos se utilizaron geles de 10 % de acrilamida.

En cada pocillo se cargaron los volúmenes correspondientes a 30 µg de proteína. En el caso de los geles del ensayo de ubicuinitación *in vivo* se cargaron 40 µL de muestra. La electroforésis se realizó empleando el sistema *mini-protean Electrophoresis System* (Bio-Rad, Murcia, España) con un voltaje constante de 120 V en un tampón compuesto por glicina 0,2 M, Tris 25 mM y SDS 0,1% (p/v).

A continuación los geles se equilibraron en el tampón de transferencia (glicina 0,1 M, Tris 12,5 mM y metanol 20 % (v/v)) aproximadamente 20 minutos. Los geles se transfirieron con un amperaje constante de 200 mA durante 90 minutos. Se utilizó hielo en el soporte para mantener evitar el calentamiento de las muestras cambiando

el hielo cada 45 minutos. Se utilizaron membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare, Lifesciences) o de PVDF (Immobilon Transfer Membranes, Millipore) en función del análisis a realizar con posterioridad, equipo Odyssey o equipo FUJI LAS 4000mini , respectivamente.

Tras la transferencia las membranas se bloquearon durante 45 minutos a 4°C con agitación. Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon en un tampón de 3% BSA (v/v) en PBS 0,01% Tween-20 (v/v) y las membranas de PVDF en leche desnatada en polvo al 2% (p/v) en TBS-T [Tris·HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1% (v/v)].

Para la inmunodetección se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios toda la noche a 4°C en agitación. Los anticuerpos se diluyeron en los mismos tampones que se habían usado para el bloqueo de sus membranas. Los anticuerpos primarios utilizados están recogidos en la tabla 1.

Tras la incubación con los anticuerpos primarios se lavaron tres veces las membranas con TBS-T o PBS según correspondiera, dejando 5 minutos de incubación entre cada lavado. Posteriormente se añadió el anticuerpo secundario y se incubó una hora. Los anticuerpos secundarios utilizados están recogidos en la tabla 1.

Las membranas de nitrocelulosa se analizaron en el equipo Odyssey (Li-cor, Bioscience, Lincoln, Nebraska, USA) y las membranas de PVDF se analizaron en el equipo Fuji LAS 4000mini (Fujifilm), utilizando el reactivo de revelado ECLprime (GE Healthcare).

Tabla 1. Anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	Marca comercial	Hospedador	Dilución	Tipo	Uso
Anti-Lamina AC	Cell Signaling	Conejo	1:1000	Policlonal	Western Blot, anticuerpo primario
Anti-GADPH	Santa Cruz Biotechnology, Inc	Ratón	1:3000	Monoclonal	Western Blot, anticuerpo primario
Anti-STBD1	Novus Biologicals	Conejo	1:1000	Policlonal	Western Blot, anticuerpo primario
Anti-HA	Sigma	Ratón	1:5000	Monoclonal	Western Blot, anticuerpo primario
Anti-c-Myc	Sigma	Ratón	1:3000	Monoclonal	Western Blot, anticuerpo primario
Anti-Flag	Sigma	Ratón	1:3000	Monoclonal	Western Blot, anticuerpo primario
IRDye®680LT Anti-xxxx	Li-Cor	Cabra	1:10000	Policlonal	Western Blot, anticuerpo secundario, Odyssey
IRDye®800CW Anti-xxxx	Li-Cor	Cabra	1:10000	Policlonal	Western Blot, anticuerpo secundario, Odyssey
Anti-IgG-ratón	Santacruz Biotechnology, Inc	Cabra	1:5000		Western Blot, anticuerpo secundario, Fuji LAS 4000mini
Anti-IgG-conejo	Santacruz Biotechnology, Inc	Cabra	1:5000		Western Blot, anticuerpo secundario, Fuji LAS 4000mini
Anti-STBD1	Novus Biologicals	Conejo	1:200	Policlonal	Microscopía, anticuerpo primario
Anti-HA	Sigma	Ratón	1:500	Monoclonal	Microscopía, anticuerpo primario
Anti-c-Myc	Sigma	Conejo	1:500	Policlonal	Microscopía, anticuerpo primario
Texas Red Anti-xxxx	Invitrogen	Cabra	1:1000		Microscopía, anticuerpo secundario
Alexa Fluor Anti-xxxx	Invitrogen	Cabra	1:1000		Microscopía, anticuerpo secundario

Microscopía

Se sembraron placas de 60 mm de diámetro con cubreobjetos, con las células de interés para su uso en los experimentos de microscopía. Tras 24 horas de incubación a 37°C se retiró el medio de las placas y se lavaron con PBS frío. Se fijaron las células con paraformaldehído 4% (10 minutos en condiciones de oscuridad). Se realizaron 3 lavados con PBS y se incubaron las placas 30 minutos con Tritón x100 al 0,2% en PBS para permeabilizar las células. Posteriormente se bloquearon 45 minutos con un tampón de bloqueo compuesto por 10% suero fetal bovino, 5% (p/v) leche desnatada en polvo, 0,5% BSA y 0.1% Triton X-100 en PBS.

Los cubreobjetos se sacaron individualmente de las placas y se depositaron en un portaobjetos. A cada uno se le añadieron 150 µL del anticuerpo primario disuelto en el tampón de bloqueo y se incubaron durante la noche a oscuras a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados están recogidos en la tabla 1.

Tras la incubación se lavaron los cubreobjetos individualmente con PBS frío y se incubaron con 150 µL del anticuerpo secundario disuelto en el tampón de bloqueo durante una hora. Se utilizaron los anticuerpos secundarios Texas Red ® (Invitrogen) para los anticuerpos primarios de ratón y Alexa Fluor ® 488 (Invitrogen) para los anticuerpos primarios de conejo, en una dilución 1:1000 en el mismo tampón que los primarios. Tras la incubación, los cubreobjetos se lavaron con PBS frío y se pegaron en un portaobjetos utilizando Aqua PolyMount® (Polysciences, IncEppelheim, Germany).

Los cubreobjetos se analizaron tanto en el microscopio vertical Leica DM RXA2 como en microscopio confocal Leica TCS SL (Leica, Wetzlar, Germany), usando el aceite de inmersión PL APO, y con el objetivo de 63x 1.4 N.A. Las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ 1.43c (Wayne Ras-band, National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Ensayo de ubicuitinación

La posible ubicuitinación de STBD1 por el complejo Malina-Laforina se estudió en células Hek293, utilizando una técnica basada en el uso de una ubiquitina marcada con 6 residuos de histidina (Figura 2), y la separación de las proteínas ubicuitinadas mediante cromatografía de afinidad (Figura 3) (Kaiser *et al.*, 2005).

Un día previo a la transfección, 3×10^6 células fueron sembradas en placas de 100 mm de diámetro. Las células se transfectaron con las combinaciones de plásmidos correspondientes para cada ensayo con el reactivo comercial X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Tras 24 horas de incubación a 37°C las placas se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C para su posterior procesamiento.

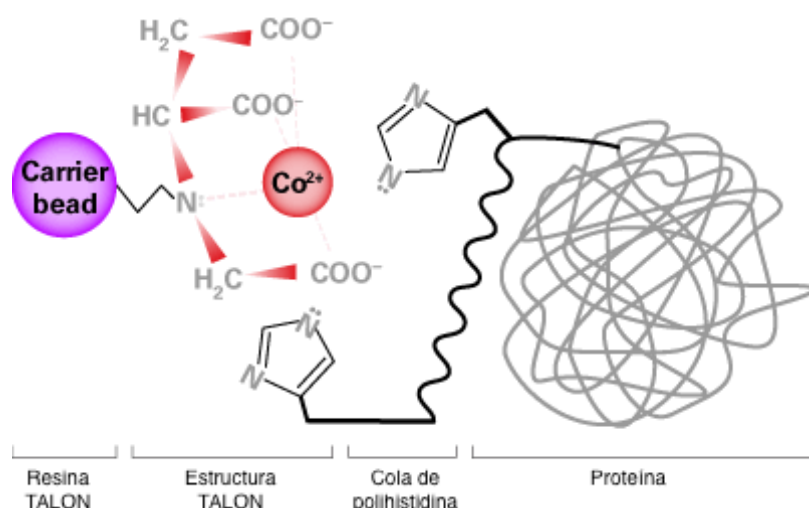


Figura 2. Análisis de ubiquitinación en células Hek293. Interacción entre la resina de Co^{2+} y el anillo imidazol de las histidinas fusionadas a la ubiquitina.

Después de descongelar las placas, se añadieron 400 μL de un tampón desnaturante que evita la acción de las deubiquitinasas (Tampón A: Cloruro de Guanidinio 6 M, Na_3PO_4 0,1 M, Tris-HCl pH8 0,1 M) a cada placa. El lisado fue retirado de las placas con un rascador y homogeneizado en jeringas de 0,5 x 16 mm (Vol 1 mL). con el objetivo de homogeneizar y facilitar la lisis celular.

A continuación se clarificaron las muestras centrifugando los tubos durante 20 minutos a 12.000 r.p.m. y la fracción soluble se recogió y se cuantificó el contenido proteico mediante la técnica de Bradford.

Para preparar la columna se añadieron a partes iguales tampón de columna (Cloruro de Guanidinio 6 M, Na_3PO_4 0,1 M, Tris-HCl pH8 0,1 M, Imidazol 10 mM, pH 8) y TALON Metal Affinity Resin (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France). Se centrifugó 1 minuto a 800 r.c.f y se descartó el sobrenadante. Añadiendo tampón de columna se llevo el volumen total al mismo que de partida y se repartió el volumen entre varios tubos eppendorf de manera que cada columna tuviera 0,3 ml de resina.

2 mg de proteína del extracto total se incubaron con 100 μL de la matriz de cobalto (TALON), previamente equilibrada en tampón B (Cloruro de Guanidinio 6 M, Na_3PO_4 0,1 M, Tris-HCl pH8 0,1 M, Imidazol 10 mM, pH 8), durante 3 h a temperatura ambiente y en rotación. Cada muestra contenía un volumen total de 1 mL y 10 mM de imidazol.

Tras la incubación se realizó un lavado de 15 min con tampón B y tres lavados de 15 min con tampón C (Urea 8 M, Na_3PO_4 0,1 M, Tris-HCl pH8 0,1 M, Imidazol 10 mM, pH 8

Finalmente, las proteínas retenidas en la resina se solubilizaron con tampón de carga (50 μL de tampón de carga 2x), se desnaturizaron durante 5 minutos a 100°C y finalmente, se congelaron para su posterior análisis mediante *western blot*.

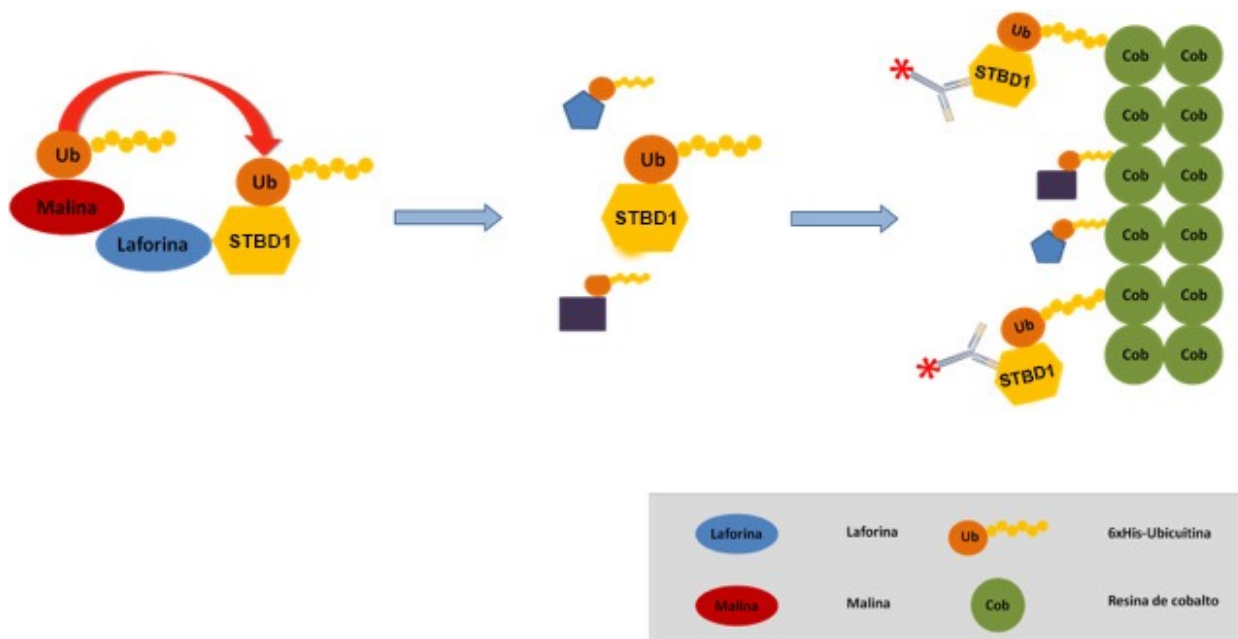


Figura 3. Análisis de ubiquitinación de STBD1. Proceso de ubiquitinación de STBD1 y su interacción con la resina de cobalto.

Resultados

1. Localización celular de STBD1

STBD1 es una proteína implicada en el metabolismo del glucógeno y se ha determinado que a nivel subcelular se localiza principalmente en el retículo endoplásmico y en el espacio perinuclear en las líneas celulares estudiadas, Rat1Neo5, FL83B y COS (Jiang, Heller et al. 2010, Zhu, Zhang et al. 2014).

En primer lugar en este proyecto, se trató de determinar si en las células escogidas para este estudio, la línea celular SH-SY5Y, el anticuerpo era capaz de reconocer la proteína endógena mediante la técnica de Western Blot. Se escogió esta línea por tratarse de un neuroblastoma humano, y ser el modelo más adecuado para el estudio de una enfermedad neurodegenerativa.

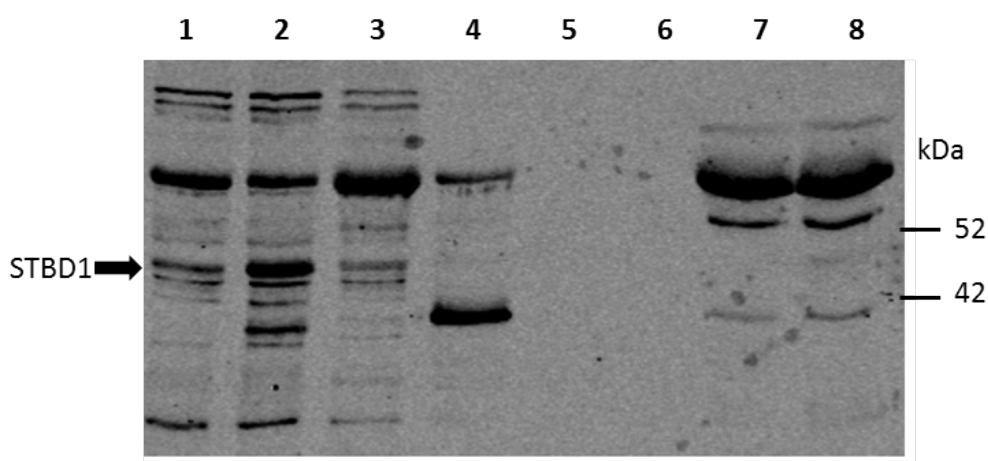


Figura 4. Prueba de detección STBD-1 endógeno: 30 μ g de cada muestra de proteínas fueron analizados mediante Western Blot e inmunodetectadas con el anticuerpo Anti-STBD1 a la dilución recomendada. Calle 1: línea celular Neuro 2A (N2a), calle 2: N2a transfectada con HA-STBD-1, calle 3: línea celular Hek293, calle 4: línea celular SH-SY5Y, calle 5: extracto de cerebro ratón control, calle 6: extracto de cerebro ratón KO laforina, calle 7: fibroblastos humanos control, calle 8: fibroblastos humanos KO laforina.

Como se puede apreciar en la Figura 4, el anticuerpo no fue capaz de detectar la proteína endógena en la línea celular SH-SY5Y, a diferencia de las líneas N2a y Hek293, donde parece que puede reconocer la proteína endógena, aunque se expresa a niveles muy bajos.

Como control positivo, se transfectaron las células N2a con el plásmido HA-STBD1 y fue detectado tanto con el anticuerpo anti STBD1, (Figura 4, calle 2) como con el anticuerpo HA (datos no mostrados).

Posteriormente se procedió a determinar la localización subcelular de STBD1 en la misma línea celular SH-SY5Y. Las células fueron transfectadas usando Xfect™

Transfection Reagent y el plásmido HA-STBD1 para su posterior análisis por Western Blot. Como control también se transfectaron las células con vector vacío.

A partir del mismo pase celular se dividieron las células para el análisis por Western Blot tras un fraccionamiento núcleo-citoplasma y para el análisis de la localización subcelular en el microscopio vertical Leica DM RXA2.

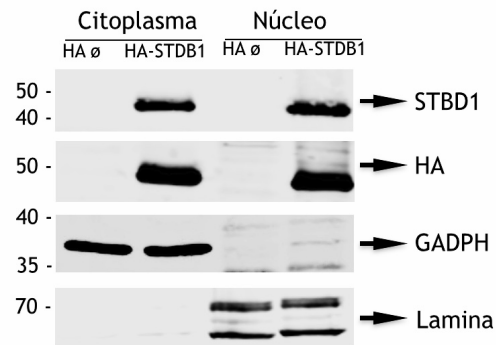


Figura 5. STBD1 está localizada en el citoplasma y en el núcleo en SH-SY5Y. Se transfectaron las células SH-SY5Y con el plásmido HA-STBD1 o con el vector expresando solo el epítipo HA, según se indica en la Figura. A las 24 horas se procesaron las muestras para el fraccionamiento núcleo-citoplasma. 30 μ g de cada muestra de proteínas fueron analizados mediante Western Blot e inmunodetectadas con los anticuerpos Anti-STBD1, Anti-HA, Anti-GADPH y Anti-Lamina.

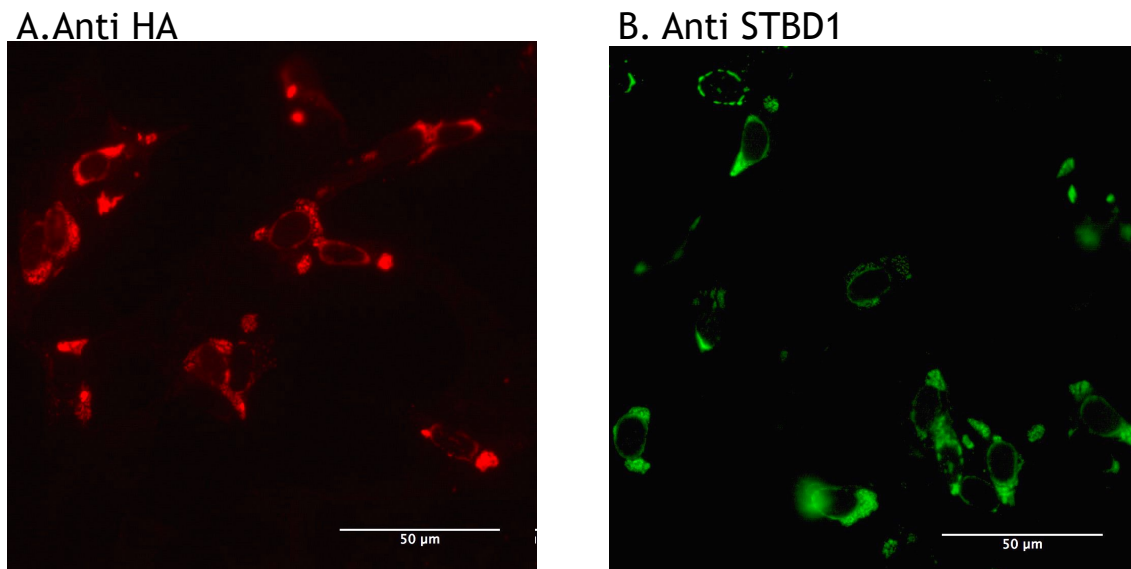


Figura 6. STBD1 está localizada en el espacio perinuclear y en el retículo endoplásmico en células SH-SY5Y. Se transfectaron las células SH-SY5Y con el plásmido HA-STBD1 o HA-vacío. A las 24 horas se procesaron las muestras según el protocolo de microscopía (Materiales y Métodos), utilizando el microscopio vertical Leica DM RXA2. A: análisis con Anti-HA. B: análisis con Anti-STBD1 en células transfectadas con HA-STBD1.

Mediante el fraccionamiento núcleo-citoplasma se consiguió separar eficazmente las proteínas de estos compartimentos (Figura 5), puesto que los correspondientes controles de fraccionamiento aparecían con la localización esperada, GADPH solamente se encuentra en el citoplasma y lamina en el núcleo. STBD1 se encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo.

El análisis de microscopia de fluorescencia (Figura 6) parece indicar una localización subcelular de STBD1 mayoritariamente en las regiones perinucleares, donde habitualmente aparece el retículo endoplásmico.

A la vista de estos resultados, se podría explicar que STBD1 aparece tanto en el núcleo como en el citoplasma mediante el fraccionamiento celular, dado que las proteínas del espacio perinuclear pueden quedar tanto en la fracción citoplasmática como en la nuclear si no se realiza un fraccionamiento más elaborado.

En conjunto, estos resultados indican que la localización celular de STBD1 en la línea celular SH-SY5Y coincide con lo descrito previamente en la literatura para otras líneas celulares, COS, Rat1Neo5 y FL83B por Zhu *et al* y Jiang *et al*.

2. Localización celular de laforina dependiente de ayuno

En estudios previos se había caracterizado la localización celular de laforina como citoplasmática (Dubey and Ganesh 2008). En cambio, cuando las células se sometían a condiciones de estrés, tanto por ayuno como por estrés térmico, tenía lugar un cambio de localización celular de laforina del citoplasma al núcleo (Sengupta, Badhwar *et al.* 2011, Singh, Singh *et al.* 2012). Todos estos estudios habían sido realizados en la línea celular COS7.

Con el objetivo de comparar la localización celular de laforina en condiciones o no de estrés en la línea celular SH-SY5Y se realizó un ensayo de transfección utilizando Xfect™ Transfection Reagent y el plásmido Myc-Laforina. Tras una incubación de 24 horas en un medio conteniendo 25 mM glucosa 37°C se cambió el medio de las células de manera que la mitad recibieron medio sin glucosa y la otra mitad medio con alta glucosa (25 mM de glucosa). Tras otra incubación de 24 horas en las mismas condiciones se les cambió el medio una segunda vez durante una hora, y se procedió entonces con el fraccionamiento celular o la microscopía. Como control también se transfectaron las células con un vector expresando sólo el epitopo Myc.

A partir del mismo pase celular se dividieron las células para el análisis por Western Blot tras un fraccionamiento núcleo-citoplasma y para el análisis en el microscopio confocal Leica TCS SL.

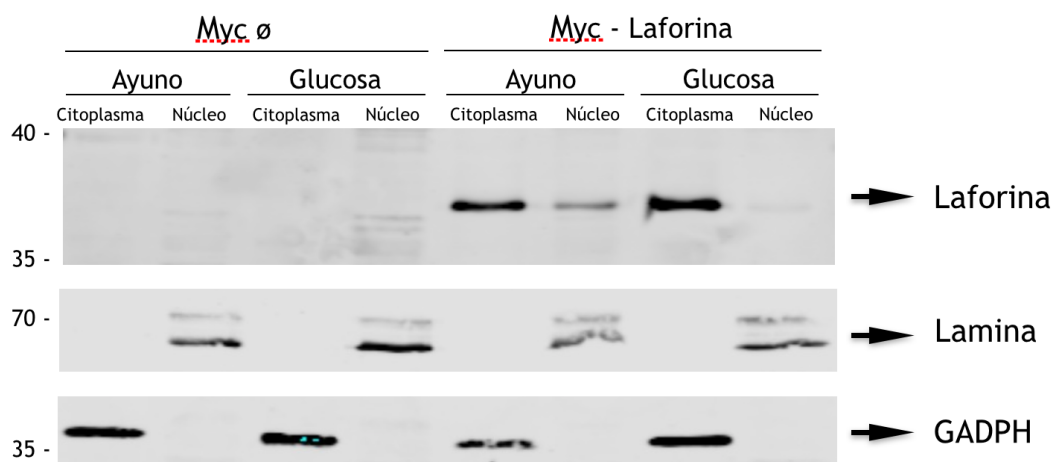


Figura 7. Laforina está localizada en el citoplasma en condiciones de alta glucosa y migra parcialmente al núcleo en condiciones de ayuno en células SY-SY5Y. Se transfectaron las células SH-SY5Y con el plásmido Myc-laforina o con un vector expresando sólo el epitopo Myc, según se indica en la Figura. A las 24 horas se cambió el medio de las células de manera que la mitad recibieran medio sin glucosa y la otra mitad medio con alta glucosa (25 mM de glucosa). Tras otra incubación de 24 horas en las mismas condiciones se les cambió el medio una segunda vez una hora antes de proceder con el fraccionamiento celular. 30 μ g de proteína de cada muestra fueron analizados mediante Western Blot e inmunodetectados con los anticuerpos Anti-Myc, Anti-Lamina y Anti-GADPH.

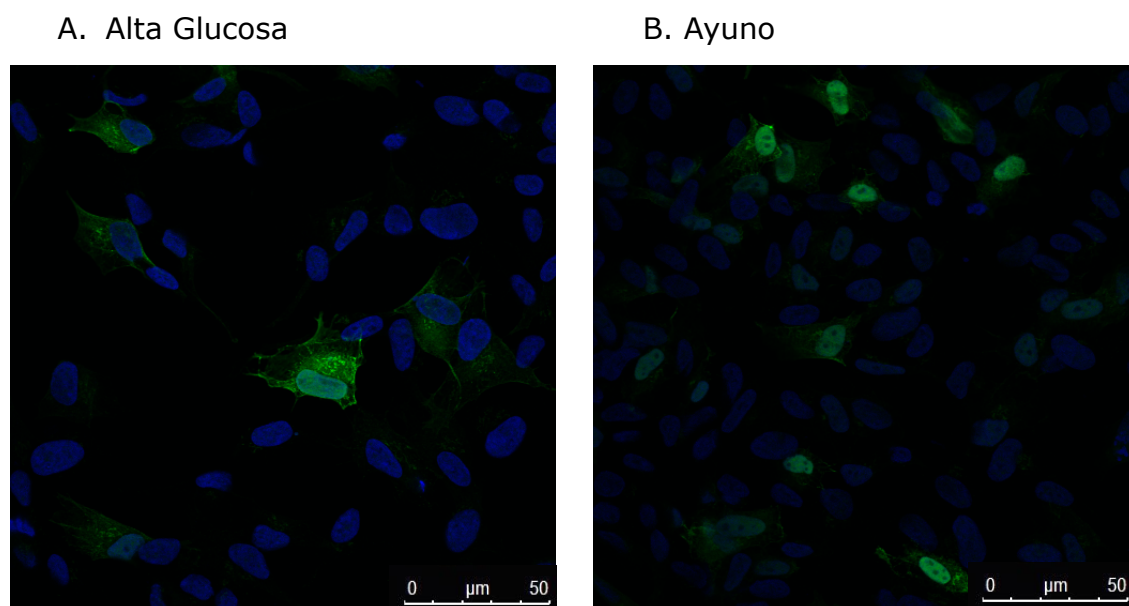


Figura 8. Laforina está localizada en el citoplasma en condiciones de alta glucosa y migra parcialmente al núcleo en condiciones de ayuno en células SH-SY5Y. Se transfectaron las células SH-SY5Y con el plásmido Myc-laforina o con un vector expresando sólo el epitopo Myc. Las células recibieron el mismo tratamiento descrito en la Figura R.4 antes de proceder con el protocolo de microscopía (Materiales y Métodos), utilizando el microscopio confocal Leica TCS SL y el anticuerpo Anti-Myc. A: células incubadas en medio con alta glucosa. B: células incubadas en condiciones de ayuno (medio sin glucosa).

El fraccionamiento núcleo-citoplasma (Figura 7) parece indicar que la localización de laforina cambia cuando las células se analizaron tras incubación en medio sin glucosa.

En estas condiciones se aprecia un enriquecimiento de laforina en el núcleo. Es decir, se aprecia como laforina migra a la fracción nuclear en condiciones de ayuno.

El análisis mediante microscopía de fluorescencia de las células (Figura 8) confirma los resultados obtenidos mediante fraccionamiento. En condiciones de alta glucosa se observa laforina en el citoplasma y en las regiones perinucleares, mientras que en condiciones de ayuno se observa laforina mayoritariamente en el núcleo celular. Estos resultados indican que la migración de laforina al núcleo en condiciones de ayuno en la línea celular SH-SY5Y coincide con lo descrito previamente en la literatura en la línea celular COS7 por Singh *et al.*

3. Localización celular de laforina en presencia de STBD1

Tras estudiar la sobreexpresión de laforina y de STBD1 por separado, se pasó a estudiar la posible variación en la localización de laforina por sobreexpresión de STBD1. Para ello se transfectaron células SH-SY5Y con Myc-laforina y HA-STBD1, así como con los correspondientes vectores vacíos como control. Se utilizó el protocolo Xfect™ Transfection Reagent y 24 horas tras la transfección se cambió el medio de las células de manera que la mitad recibieron medio sin glucosa y la otra mitad medio con alta glucosa (25 mM de glucosa), tal como se había hecho previamente. Tras una incubación de 24 horas a 37°C se les cambió el medio y una hora después se procedió con el fraccionamiento celular o la microscopía. Éste último cambio de medio se realizó puesto que durante las 24 horas de incubación las células crecieron y consumieron los nutrientes del medio en el que se encontraban, entre ellos la glucosa. El estrés que provoca estar en un medio con menores niveles de glucosa no pudo ser evitado completamente, por lo que laforina migró parcialmente al núcleo en nuestras condiciones experimentales de alta glucosa, como se aprecia en la Figuras 9 y en la Figura 10.

A partir del mismo pase celular se dividieron las células para el análisis por Western Blot tras un fraccionamiento núcleo-citoplasma y para el análisis en el microscopio confocal Leica TCS SL.

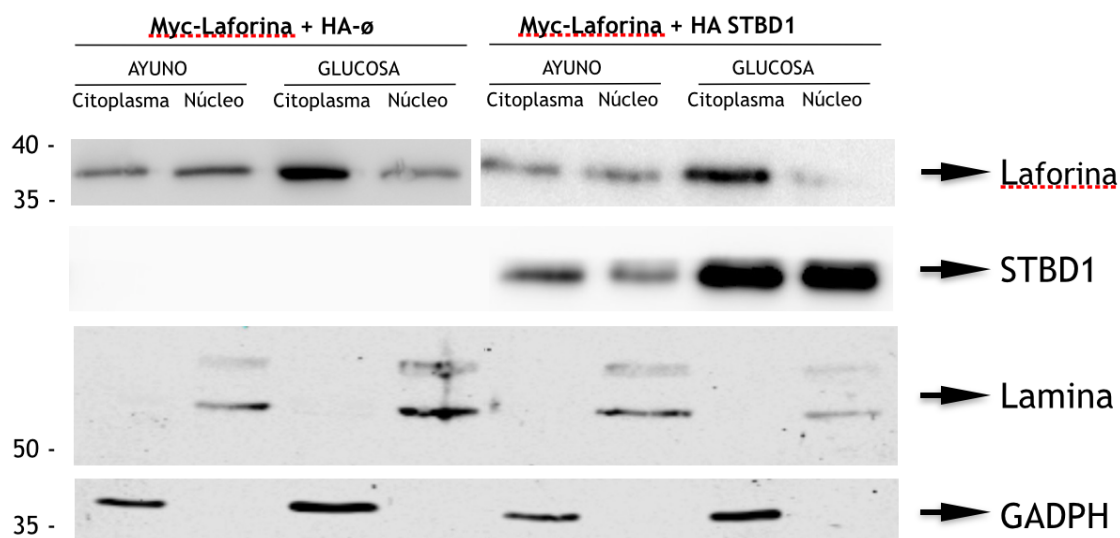
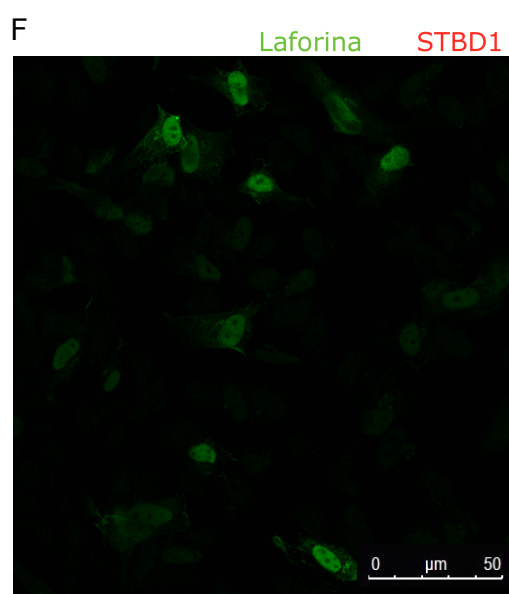
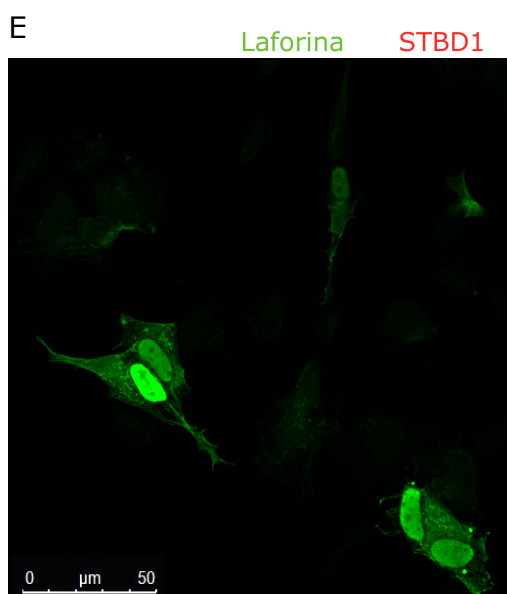
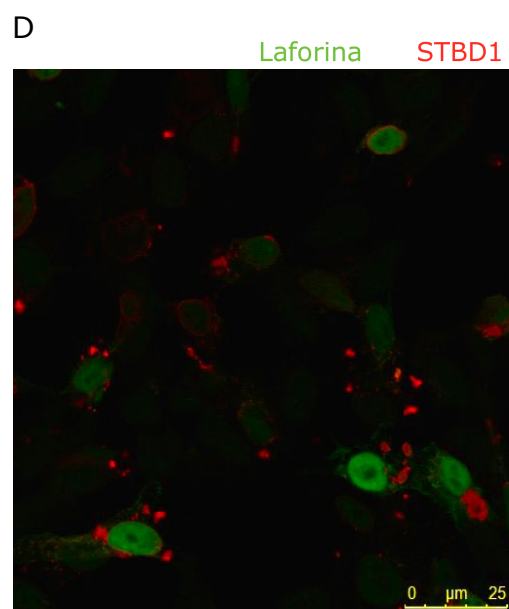
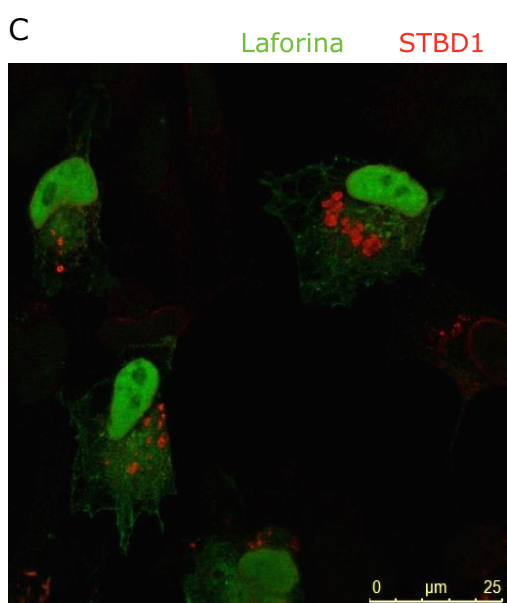
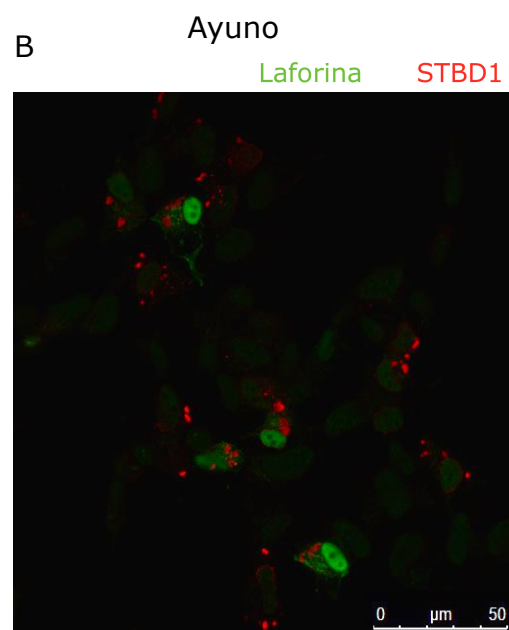
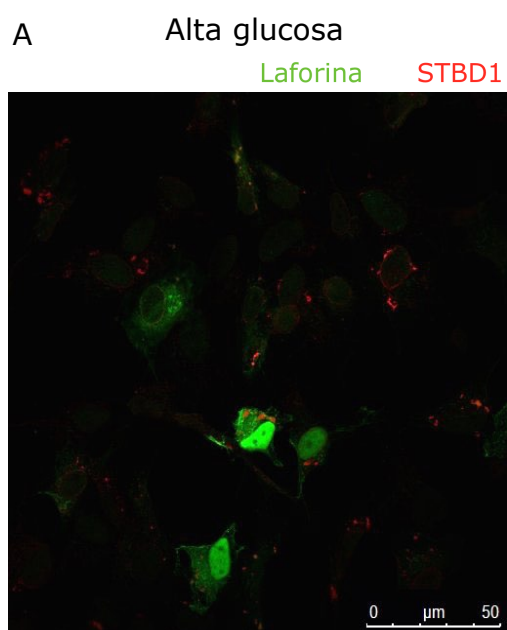


Figura 9. Laforina está localizada en el citoplasma en condiciones de alta glucosa y migra al núcleo en condiciones de ayuno en SY-SY5Y, independientemente de la sobreexpresión de STBD1. Se transfectaron las células SH-SY5Y con el plásmido Myc-laforina y HA-STBD1 o con los vectores que sólo contenían los epítomos, según se indica en la Figura. A las 24 horas se cambió el medio de las células de manera que la mitad recibieron medio sin glucosa y la otra mitad medio con alta glucosa (25 mM de glucosa). Tras otra incubación de 24 horas en las mismas condiciones se les cambió el medio una segunda vez una hora antes de proceder con el fraccionamiento celular. 30 µg de cada muestra de proteínas fueron analizados mediante Western Blot e inmunodetectados con los anticuerpos Anti-Myc, Anti-HA, Anti-Lamina y Anti-GADPH.



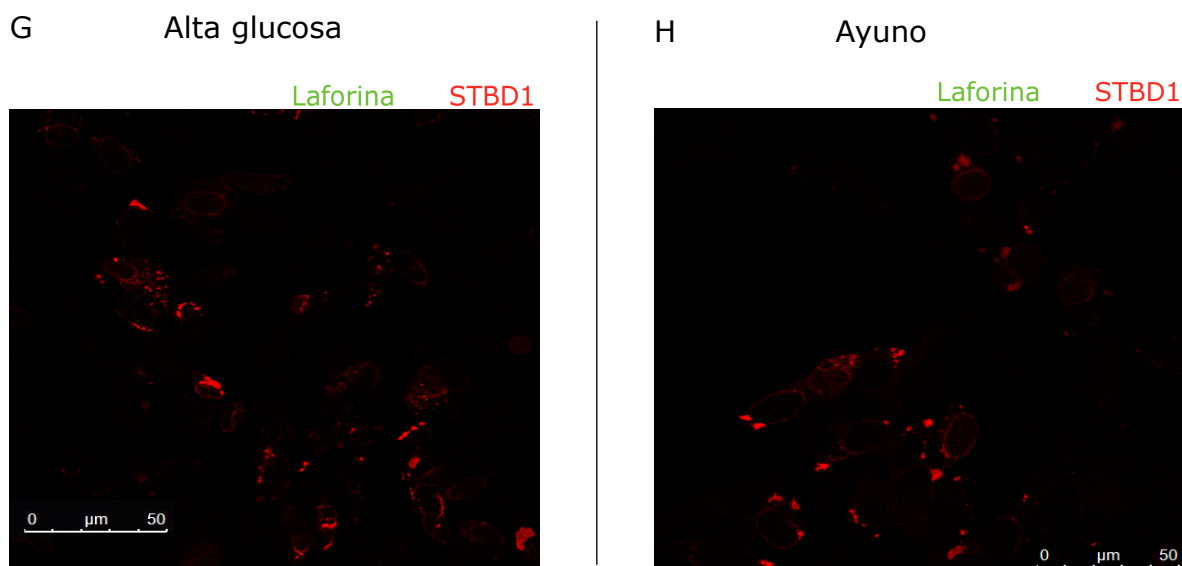


Figura 10. Laforina está localizada en el citoplasma en condiciones de alta glucosa y migra al núcleo en condiciones de ayuno en SH-SY5Y, independientemente de la sobreexpresión de STBD1. Se transfectaron las células SH-SY5Y con el plásmido Myc-laforina y HA-STBD1 o con los vectores que sólo contenían los epítomos. Las células recibieron el mismo tratamiento descrito en la Figura R.6 antes de proceder con el protocolo de microscopía (Materiales y Métodos), utilizando el microscopio confocal Leica TCS SL y el anticuerpo Anti-Myc. A, B, C y D: células transfectadas con los plásmidos Myc-laforina y HA-STBD1,. E y F: células transfectadas con el plásmido Myc-laforina y el plásmido con sólo el epítipo HA. G y H: células transfectadas con el plásmido HA-STBD1 y el plásmido con sólo el epítipo Myc. Las células se incubaron en medios con alta glucosa o en condiciones de ayuno, sin glucosa como se indica en la Figura.

Laforina migra al núcleo en condiciones de ayuno tanto en las células transfectadas con el plásmido HA-STBD1 como en las células control transfectadas con el vector que sólo contenía el epítipo. En condiciones de alta glucosa laforina se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma, mientras que en condiciones de ayuno su localización es nuclear. Esto se puede apreciar tanto en el fraccionamiento núcleo-citoplasma (Figura 9) como en el análisis de fluorescencia por microscopía (Figura 10). El recuento pormenorizado de la localización celular de laforina en células transfectadas para microscopía confirma los resultados obtenidos en el fraccionamiento (Figura 11). Hay que destacar el hecho de que aquellas células donde se puede apreciar la localización nuclear y citoplasmática de laforina, las células que recibieron el tratamiento de ayuno tienen más intensidad de señal en el núcleo, lo que se corresponde a más concentración de laforina, que las células que recibieron el tratamiento de alta glucosa.

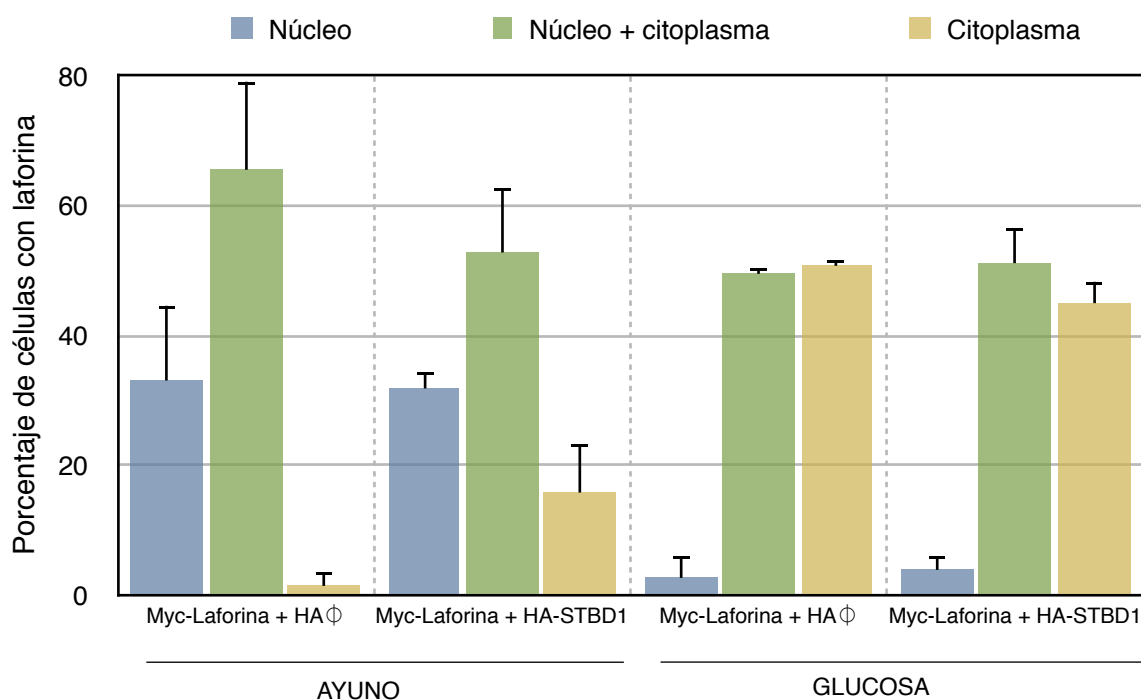


Figura 11. Porcentaje de localización de laforina en condiciones de ayuno y alta glucosa. Se transfectaron las células SH-SY5Y con el plásmido Myc-laforina y HA-STBD1. Las células fueron sometidas a los tratamientos y análisis indicados en la Figura R.7. Se contaron el número de células que contenían laforina, distinguiendo entre las células que tenían laforina solamente en el núcleo (azul), aquellas que tenían laforina en el núcleo y en el citoplasma (verde) y aquellas que tenían laforina solamente en el citoplasma (amarillo). La media corresponde a dos experimentos y un total de 312 células contadas.

4. Ensayo de ubiquitinación de STBD1

Después de estudiar la localización celular de laforina en presencia de STBD1 se decidió estudiar la segunda hipótesis, si STBD1 pudiera ser un sustrato de ubiquitinación del complejo que forman malina-laforina.

Para ello se transfectaron células Hek-293 siguiendo el protocolo X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent y usando los plásmidos HA-STBD1, Flag-malina, Flag-laforina y pBSK-Ubiquitin-6xHis. Las células fueron incubadas 24 horas a 37°C y crecieron en monocapa, se les retiró el medio y se congelaron en nitrógeno líquido hasta que fueron procesadas. Se realizó un ensayo de ubiquitinación, reservando parte del lisado celular para analizar la transfección. El producto del ensayo de ubiquitinación y el extracto celular se analizaron por Western Blot.

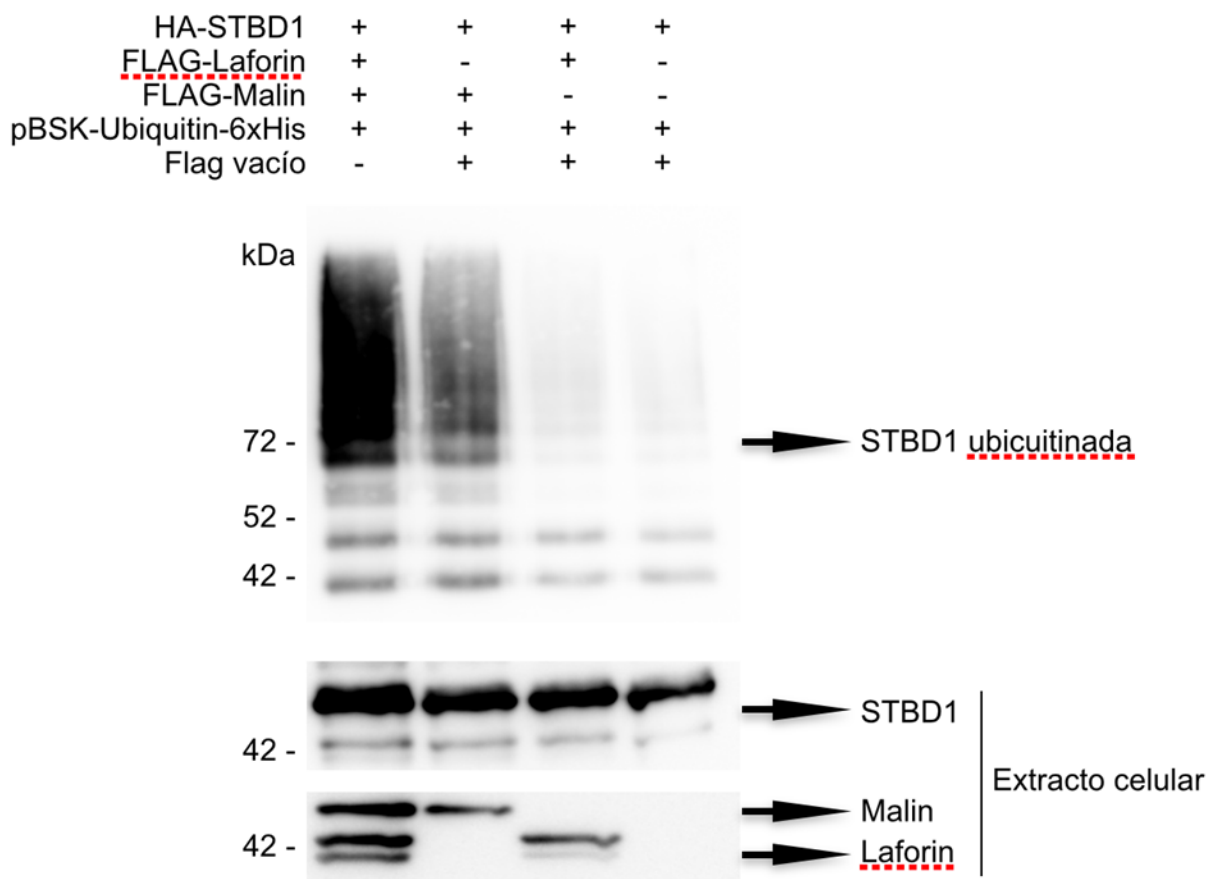


Figura 12. STBD1 es un sustrato de ubiquitinación por el complejo malina-laforina. Se transfectaron las células Hek293 con los plásmidos HA-STBD1, pBSK-Ubiquitin-6xHis, Flag-malin, Flag-laforin o con Flag-vacío según se indica en la Figura. Tras 24 horas de incubación se congelaron en nitrógeno líquido. Se realizó un ensayo de ubiquitinación como se indica en Material y Métodos y las muestras se analizaron por Western Blot. Los anticuerpos anti-STBD1 y anti-FLAG fueron utilizados para la inmunodetección.

La transfección de Hek293 con HA-STBD1, Flag-malina, Flag-laforina y pBSK-Ubiquitin-6xHis resultó en unos mayores niveles de ubiquitinación de STBD1 (Figura 12). Se puede observar mayor ubiquitinación en la primera calle por la izquierda de la figura 12, donde las células tenían los plásmidos con STBD1, malina y laforina. Cuando las células tenían el plásmido de malina pero no el de laforina también se observaba ubiquitinación. Esto se debe a que la línea celular utilizada, Hek293, contiene laforina endógena. Cuando las células no tenían los plásmido de malina y laforina, o no tenían el de laforina, STBD1 no era ubiquitinada.

Se decidió entonces estudiar la topología de las cadenas poliubiquitinadas, ya que esto indicaría el destino de la proteína modificada. Para ello, se transfectaron células Hek293 siguiendo en mismo protocolo que en el experimento anterior, pero usando los plásmidos HA-STBD1, Flag-malina, Flag-laforina, Ubiquitin-6xHis, y los mutantes 6xHisUbiq K48R y 6xHisUbiq K63R. El producto del ensayo de ubiquitinación y el lisado celular se analizaron por Western Blot

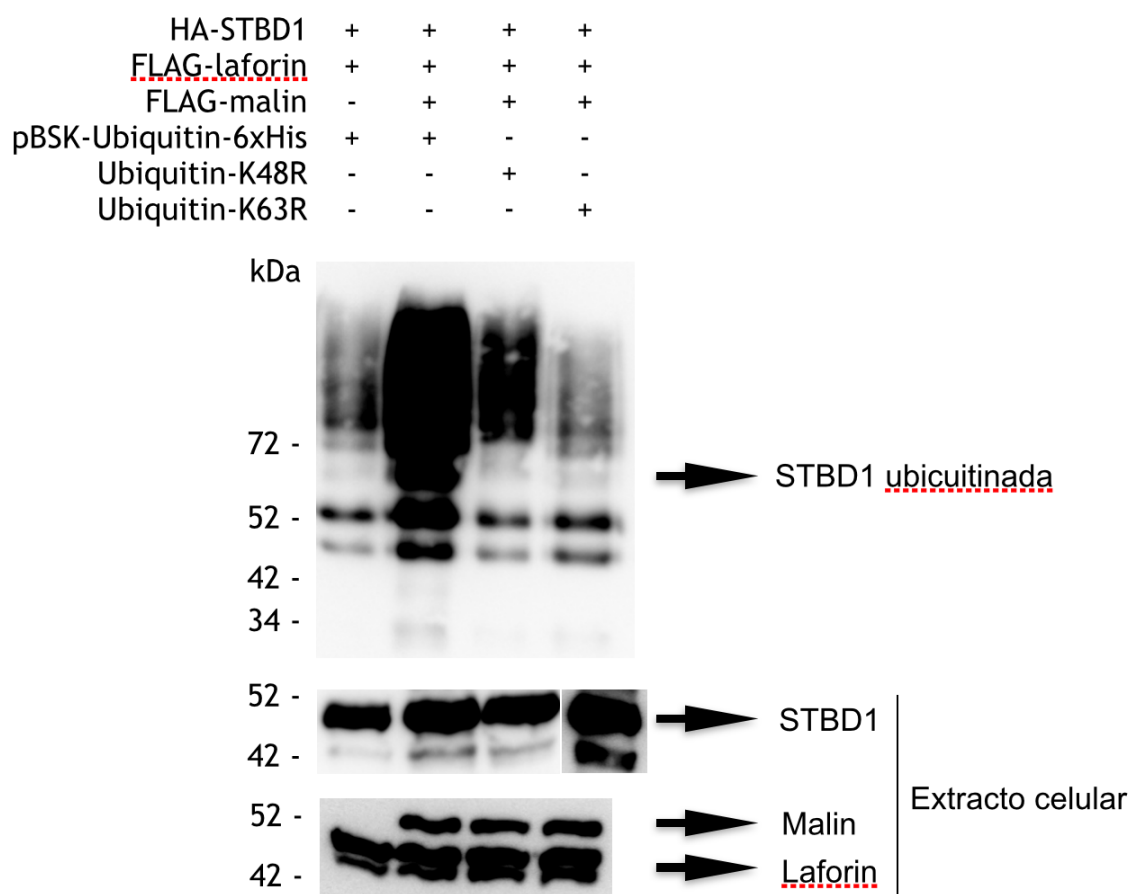


Figura 13. STBD1 es poliubiquitinada a través del residuo K63. Se transfectaron las células Hek293 con los plásmidos HA-STBD1, Flag-malin, Flag-laforin, pBSK-Ubiquitin-6xHis, Flag-vacío, pCMV-6xHisUbiq K48R o K63R según se indica en la Figura. Tras 24 horas de incubación se congelaron en nitrógeno líquido. Se realizó un ensayo de ubiquitinación como se indica en Material y Métodos y las muestras se analizaron por Western Blot. Los anticuerpos anti-STBD1 y anti-FLAG fueron utilizados para la inmunodetección.

Los resultados indican que la ubiquitinación de STBD1 es menor cuando las células se transfectaron con Ubiquitina K63R (Figura 13), lo que significa que cuando las células no pueden formar cadenas de poliubiquitina a través del residuo K63, la ubiquitinación de STBD1 disminuye. Esto quiere decir que la ubiquitinación de STBD1 ocurre generalmente a través del residuo K63. La poliubiquitinación a través del residuo K63 ha sido descrito en otras proteínas que son sustrato del complejo malina-laforina (Moreno, Towler et al. 2010, Rubio-Villena, Garcia-Gimeno et al. 2013).

Discusión

A pesar de que la enfermedad de Lafora fue descrita hace más de 100 años, los mecanismos fisiopatológicos que conducen a la patología característica de la misma todavía no están claros. El fenotipo de esta enfermedad se caracteriza por el acúmulo de poliglucosanos insolubles en diversos tejidos (llamados cuerpos de Lafora), signos de neurodegeneración que conducen a la muerte neuronal y una clara desregulación de la homeostasis de proteínas (proteostasis).

Indudablemente el acúmulo de cuerpos de Lafora en diversos tejidos es uno de los signos distintivos de la enfermedad que, de hecho, se utiliza como clave diagnóstica previo al estudio genético de los pacientes. Sin embargo, todavía existe controversia en el campo sobre si dicho acúmulo es el responsable directo de la patología o más bien, una defensa de la homeostasis frente a la desregulación de las distintas rutas afectadas por la falta de un complejo malina-laforina funcional.

Por todo ello, las líneas de estudio que determinen los mecanismos alterados en la formación y/o degradación de los cuerpos de Lafora, presenta un enorme interés tanto para conocer el desarrollo de la enfermedad como su posible tratamiento.

Recientemente se describió que Stbd1 (Starch binding domain-containing protein 1) podría estar implicada en el metabolismo del glucógeno, siendo un candidato capaz de anclar glucógeno a las membranas (Jiang, 2010). Además, por un mecanismo todavía no identificado, participaría en el tráfico del glucógeno al lisosoma (Jiang et al. 2011) y por lo tanto, en su degradación.

Stbd1 posee un dominio N-terminal hidrofóbico que le permite anclarse a las membranas, y un dominio C-terminal CBM20 que le permite unirse al glucógeno. Este es el mismo dominio presente en laforina, y de manera similar a esta fosfatasa, Stbd1 se une mejor a polisacáridos poco ramificados.

Por otra parte, también se ha demostrado que STBD1 es capaz de interaccionar con laforina y, aunque se desconoce el significado de dicha interacción, ocurre sobre todo en condiciones de estrés, de carencia de glucógeno. La laforina se encuentra mayoritariamente en el citoplasma (Dubey and Ganesh 2008), pero se ha visto que la sobreexpresión de STBD1 hace que cambie su localización a la membrana del RE (Zhu et al. 2014). Bajo una situación de estrés, como pueden ser niveles bajos de glucosa en el medio extracelular, la laforina migra del citoplasma hacia el núcleo (Singh et al. 2012). Ante estos datos, cabría la posibilidad de que STBD1 podría actuar como una proteína de anclaje, que mantuviera la laforina en el citoplasma en situaciones no estresantes.

El modelo de estudio de este trabajo, las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, no habían sido utilizadas previamente en los estudios descritos con anterioridad. En primer lugar, determinamos que la sobreexpresión de Stbd1 inducía la formación de estructuras perinucleares grandes que correspondían al retículo endoplásmico, como ya había sido descrito para otras líneas celulares (Zhu, Zhang et al. 2014). A

continuación, se analizó la localización subcelular de laforina en condiciones de ayuno y se comparó con la localización en condiciones de alta glucosa en la misma línea celular, SH-SY5Y, comprobando que también ocurría la migración al núcleo de la laforina en condiciones de ayuno.

Si nuestra hipótesis era correcta, al sobreexpresar STBD1 y laforina conjuntamente, esta última no migraría al núcleo en condiciones de ayuno, pues STBD1 la retendría en el citoplasma. Sin embargo, los resultados obtenidos han demostrado que la laforina migra al núcleo en situaciones de estrés independientemente de la sobreexpresión de STBD1.

No obstante, la interacción entre ambas proteínas podría tener otro significado fisiológico. Dado que se ha visto que Stbd1 se ubiquitina (Zhu et al. 2014), y el complejo malina-laforina promueve la ubiquitinación de proteínas involucradas en el metabolismo de glucógeno, realizamos un ensayo de ubiquitinación de STBD1 por dicho complejo.

Nuestros ensayos demostraron que Stbd1 es un sustrato de ubiquitinación del complejo malina-laforina, con una topología de unión de los residuos de ubiquitina en la lisina 63. Esta es la topología de poliubiquitinación característica de la malina, cuya función es dirigir las proteínas así marcadas a su degradación mediante autofagia. Esto podría sugerir un mecanismo adicional de la regulación de la cantidad de glucógeno intracelular mediante el complejo laforina-malina.

Bibliografía

- Bouju, S., M. F. Lignon, G. Pietu, M. Le Cunff, J. J. Leger, C. Auffray and C. A. Dechesne (1998). "Molecular cloning and functional expression of a novel human gene encoding two 41-43 kDa skeletal muscle internal membrane proteins." Biochem J 335 (Pt 3): 549-556.
- Chan, E., D. Bulman, A. Paterson, J. Turnbull, E. Andermann, F. Andermann, G. Rouleau, A. Delgado-Escueta, S. Scherer and B. Minassian (2003). "Genetic mapping of a new Lafora progressive myoclonus epilepsy locus (EPM2B) on 6p22." Journal of Medical Genetics 40(9): 671-675.
- Cheng, A., M. Zhang, M. S. Gentry, C. A. Worby, J. E. Dixon and A. R. Saltiel (2007). "A role for AGL ubiquitination in the glycogen storage disorders of Lafora and Cori's disease." Genes Dev 21(19): 2399-2409.
- Dubey, D. and S. Ganesh (2008). "Modulation of functional properties of laforin phosphatase by alternative splicing reveals a novel mechanism for the EPM2A gene in Lafora progressive myoclonus epilepsy." Human Molecular Genetics 17(19): 3010-3020.
- Garyali, P., P. Siwach, P. K. Singh, R. Puri, S. Mittal, S. Sengupta, R. Parihar and S. Ganesh (2009). "The malin-laforin complex suppresses the cellular toxicity of misfolded proteins by promoting their degradation through the ubiquitin-proteasome system." Hum Mol Genet 18(4): 688-700.
- Gentry, M. S., C. Romá-Mateo and P. Sanz (2013). "Laforin, a protein with many faces: glucan phosphatase, adapter protein, et alii." FEBS Journal 280(2): 525-537.
- Ikeda, F. and I. Dikic (2008). "Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series." EMBO Rep 9(6): 536-542.
- Jiang, S., B. Heller, V. S. Tagliabracci, L. Zhai, J. M. Irimia, A. A. DePaoli-Roach, C. D. Wells, A. V. Skurat and P. J. Roach (2010). "Starch Binding Domain-containing Protein 1/Genethonin 1 Is a Novel Participant in Glycogen Metabolism." The Journal of Biological Chemistry 285(45): 34960-34971.
- Jiang, S., C. D. Wells and P. J. Roach (2011). "Starch-binding domain-containing protein 1 (Stbd1) and glycogen metabolism: Identification of the Atg8 family interacting motif (AIM) in Stbd1 required for interaction with GABARAPL1." Biochem Biophys Res Commun 413(3): 420-425.
- Lafora, G. R., Glueck, B. Z. (1911). "Beitrag zur histopathologie der myoklonischen Epilepsie." Z Ges Neurol Psychiat 6: 14.
- Minassian, B. A., J. R. Lee, J.-A. Herbrick, J. Huizenga, S. Soder, A. J. Mungall, I. Dunham, R. Gardner, C.-y. G. Fong, S. Carpenter, L. Jardim, P. Satishchandra, E. Andermann, O. C. Snead, I. Lopes-Cendes, L.-C. Tsui, A. V. Delgado-Escueta, G. A. Rouleau and S. W. Scherer (1998). "Mutations in a gene encoding a novel

protein tyrosine phosphatase cause progressive myoclonus epilepsy." Nat Genet 20(2): 171-174.

Moreno, D., M. C. Towler, D. G. Hardie, E. Knecht and P. Sanz (2010). "The laforin-malin complex, involved in Lafora disease, promotes the incorporation of K63-linked ubiquitin chains into AMP-activated protein kinase beta subunits." Mol Biol Cell 21(15): 2578-2588.

Moreno, D., M. C. Towler, D. G. Hardie, E. Knecht and P. Sanz (2010). "The Laforin–Malin Complex, Involved in Lafora Disease, Promotes the Incorporation of K63-linked Ubiquitin Chains into AMP-activated Protein Kinase β Subunits." Molecular Biology of the Cell 21(15): 2578-2588.

Morimoto, R. I. (1998). "Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators." Genes Dev 12(24): 3788-3796.

Pickart, C. M. and D. Fushman (2004). "Polyubiquitin chains: polymeric protein signals." Current Opinion in Chemical Biology 8(6): 610-616.

Ramachandran, N., J.-M. Girard, J. Turnbull and B. A. Minassian (2009). "The autosomal recessively inherited progressive myoclonus epilepsies and their genes." Epilepsia 50: 29-36.

Reichelt, M. E., K. M. Mellor, C. L. Curl, D. Stapleton and L. M. D. Delbridge (2013). "Myocardial glycophagy — A specific glycogen handling response to metabolic stress is accentuated in the female heart." Journal of Molecular and Cellular Cardiology 65: 67-75.

Rubio-Villena, C., M. A. Garcia-Gimeno and P. Sanz (2013). "Glycogenic activity of R6, a protein phosphatase 1 regulatory subunit, is modulated by the laforin–malin complex." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 45(7): 1479-1488.

Sengupta, S., I. Badhwar, M. Upadhyay, S. Singh and S. Ganesh (2011). "Malin and laforin are essential components of a protein complex that protects cells from thermal stress." Journal of Cell Science 124(13): 2277-2286.

Sharma, J., S. N. Rao, S. K. Shankar, P. Satishchandra and N. R. Jana (2011). "Lafora disease ubiquitin ligase malin promotes proteasomal degradation of neuronatin and regulates glycogen synthesis." Neurobiol Dis 44(1): 133-141.

Singh, P. K., S. Singh and S. Ganesh (2012). "The Laforin-Malin Complex Negatively Regulates Glycogen Synthesis by Modulating Cellular Glucose Uptake via Glucose Transporters." Molecular and Cellular Biology 32(3): 652-663.

Singh, S. and S. Ganesh (2009). "Lafora progressive myoclonus epilepsy: a meta-analysis of reported mutations in the first decade following the discovery of the EPM2A and NHLRC1 genes." Hum Mutat 30(5): 715-723.

Tagliabracci, V. S., C. Heiss, C. Karthik, C. J. Contreras, J. Glushka, M. Ishihara, P. Azadi, T. D. Hurley, A. A. DePaoli-Roach and P. J. Roach (2011). "Phosphate incorporation during glycogen synthesis and Lafora disease." Cell Metab 13(3): 274-282.

- Tagliabracci, V. S., J. Turnbull, W. Wang, J. M. Girard, X. Zhao, A. V. Skurat, A. V. Delgado-Escueta, B. A. Minassian, A. A. Depaoli-Roach and P. J. Roach (2007). "Laforin is a glycogen phosphatase, deficiency of which leads to elevated phosphorylation of glycogen in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A 104(49): 19262-19266.
- Vernia, S., T. Rubio, M. Heredia, S. R. de Córdoba and P. Sanz (2009). "Increased Endoplasmic Reticulum Stress and Decreased Proteasomal Function in Lafora Disease Models Lacking the Phosphatase Laforin." PLoS ONE 4(6): e5907.
- Vilchez, D., S. Ros, D. Cifuentes, L. Pujadas, J. Valles, B. Garcia-Fojeda, O. Criado-Garcia, E. Fernandez-Sanchez, I. Medrano-Fernandez, J. Dominguez, M. Garcia-Rocha, E. Soriano, S. Rodriguez de Cordoba and J. J. Guinovart (2007). "Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy." Nat Neurosci 10(11): 1407-1413.
- Vilchez, D., S. Ros, D. Cifuentes, L. Pujadas, J. Valles, B. Garcia-Fojeda, O. Criado-Garcia, E. Fernandez-Sanchez, I. Medrano-Fernandez, J. Dominguez, M. Garcia-Rocha, E. Soriano, S. Rodriguez de Cordoba and J. J. Guinovart (2007). "Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy." Nat Neurosci 10(11): 1407-1413.
- Wang, J., J. A. Stuckey, M. J. Wishart and J. E. Dixon (2002). "A Unique Carbohydrate Binding Domain Targets the Lafora Disease Phosphatase to Glycogen." Journal of Biological Chemistry 277(4): 2377-2380.
- Worby, C. A., M. S. Gentry and J. E. Dixon (2008). "Malin decreases glycogen accumulation by promoting the degradation of protein targeting to glycogen (PTG)." The Journal of biological chemistry 283(7): 4069-4076.
- Yokoi, S., J. Austin, F. Witmer and M. Sakai (1968). "Studies in myoclonus epilepsy (lafora body form): I. isolation and preliminary characterization of lafora bodies in two cases." Archives of Neurology 19(1): 15-33.
- Zhu, Y., M. Zhang, Amber R. Kelly and A. Cheng (2014). "The carbohydrate-binding domain of overexpressed STBD1 is important for its stability and protein–protein interactions." Bioscience Reports 34(4): e00117.